Aus dem Hygienischen Institut der Universität München

JUN 22 1921

Äquilibrierte Salzlösungen als indifferente Suspensionsflüssigkeiten für Bakterien

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde

der

tierärztlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Max Zeug
approbiertem Tierarzt aus Ratibor
Veterinär d. R.

Druck von R. Oldenbourg in München
1920

Aus dem Hygienischen Institut der Universität München

Äquilibrierte Salzlösungen als indifferente Suspensionsflüssigkeiten für Bakterien

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde

der

tierärztlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Max Zeug
approbiertem Tierarzt aus Ratibor
Veterinär d. R.

Druck von R. Oldenbourg in München
1920

Gedruckt mit Genehmigung der tierärztlichen Fakultät der Universität München.

Referent: Professor Dr. Süpfle.

In der Bakteriologie werden die Aufschwemmungen lebender Bakterien gewöhnlich mit Hilfe einer 0,85 proz. Kochsalzlösung hergestellt. Diese Übung geht von der Voraussetzung aus, daß die noch immer sogenannte physiologische Kochsalzlösung ein Medium ist, das für alle Bakterien indifferent sei. Zweifellos trifft diese Voraussetzung für gewisse Fälle zu. Aber es gibt Bakterien, für die die physiologische Kochsalzlösung keineswegs eine indifferente Suspensionsflüssigkeit ist. Je nach der Versuchsanordnung (spärliche Keimeinsaat) und der Art der Bakterien (z. B. Vibrionen) kann sich die deletäre Wirkung der Kochsalzlösung sogar in einer überraschend schnellen Keimverminderung geltend machen, wie die schönen Versuche von Martin Ficker[1]) dargetan haben. Der Brauch, lebende Bakterien für bestimmte Versuchszwecke in 0,85 proz. Kochsalzlösung aufzuschwemmen, kann zu groben Fehlern führen und hat sicher oft genug irrtümliche Schlußfolgerungen veranlaßt. Wer die giftige Wirkung der physiologischen Kochsalzlösung auf verschiedene Bakterien kennt, benutzt an ihrer Stelle meist ein Gemisch aus 90 Teilen physiologischer Kochsalzlösung und 10 Teilen gewöhnlicher Bouillon. Diese Flüssigkeit ist sicher unschädlich für Bakterien, hat aber den Nachteil, daß sie manche Bakterienarten bei längerer Beobachtungsdauer zur Vermehrung bringt, was für viele Versuche unerwünscht ist.

1) Martin Ficker, Über Lebensdauer und Absterben von pathogenen Keimen. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 29, S. 1.

Ich habe mir daher auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Karl Süpfle, dem ich für seine Unterstützung ergebenst danke, die Aufgabe gestellt, indifferente Suspensionsflüssigkeiten für solche Bakterien zu finden, die in 0,85 proz. Kochsalzlösung in kurzer Zeit absterben.

Der Weg, Aufschwemmungsmedien zu suchen, in denen Bakterien an Zahl weder zunehmen, noch innerhalb einer gewissen Frist erheblich abnehmen, war durch bestimmte Forschungsergebnisse der Tierphysiologie einigermaßen vorgezeichnet.

Sidney Ringer[1]) hat entdeckt, daß Muskeln in reiner, isotonischer Kochsalzlösung abnorme Zustände zeigen und rascher zugrundegehen, als in Kochsalzlösung mit Zusatz von Kalium- und Kalziumsalzen in Mengen, wie sie ungefähr im Blut vorkommen. Seit diesen Untersuchungen ist die alte physiologische Kochsalzlösung in der Tierphysiologie verdrängt worden durch die sogenannte Ringersche oder Ringer-Lockesche Lösung; sie enthält, je nachdem man es mit Frosch- oder Säugetierorganen zu tun hat, im Liter ungefähr NaCl 6,5—9,5 g, KCl 0,2 g, $CaCl_2$ 0,2 g, NaH CO_3 0,1 g.

Auch für Meerestiere sind reine Salzlösungen schädlich, dagegen Gemische von Salzen unschädlich. Jaques Loeb[2]) konnte zeigen, daß befruchtete Funduluseier in reiner Kochsalzlösung absterben; in Kochsalzlösung dagegen, der eine kleine Spur eines löslichen Kalziumsalzes hinzugefügt wird, entwickeln sich alle Eier und bilden normale Embryonen. Die ausgeschlüpften Fische, die in der reinen Kochsalzlösung ebenfalls sterben, bleiben dauernd am Leben, wenn man der Kochsalzlösung außer Kalziumsalz noch etwas Kaliumchlorid hinzufügt. Wie Lillie[3]) nachwies, sind ganz entsprechende Bedingungen für die Cilienbewegung der Meerestiere maßgebend.

Auch Pflanzen zeigen ein ähnliches Verhalten. Nach den Untersuchungen von Osterhout[4]) ertragen Algen, Equisetaceen, Lebermoose, Gramineen u. a. reine Salzlösungen sehr schlecht, dagegen Gemische von NaCl, KCl und $CaCl_2$ in bestimmten Proportionen sehr gut.

Alle diese Ergebnisse der Tier- und Pflanzenphysiologie stimmen darin überein, daß reine Salzlösungen, die für sich allein zum Teil sehr giftig wirken, gemeinsam, in geeigneter Mischung, ungiftig sind. Zwischen den einzelnen Salzen besteht also eine antagonistische Wirkung. Wie Loeb darlegte, spielt bei der Entgiftung des Na-Jons die Wertigkeit des Jons des entgiftenden Salzes

---

1) Sidney Ringer, Journ. of physiol. 4, 7, 18 (1883, 1886, 1895).

2) Jaques Loeb, Über den Einfluß der Wertigkeit und möglicherweise der elektr. Ladung von Jonen auf ihre antitoxische Wirkung. Pflügers Arch., Bd. 88, S. 68, 1901.

3) Ralf Lillie, American. Journ. of physiol. 10, 419 (1904) u. 17, 89 (1906).

4) Osterhout, Journ. of biol. chem. 1, 363 (1905); Botan. Gazette 42, 127 (1906); 44, 259 (1907); 45, 45 (1908); 54, 532 (1912); Jahrb. f. wissenschaftliche Botanik, 40, 121 (1908).

eine Rolle. Nur die Kationen und zwar besonders die zweiwertigen wirken entgiftend, Anionen dagegen nicht.

Mit Jaques Loeb bezeichnet man solche unschädliche Gemische verschiedener Elektrolyte als ausbalanzierte oder physiologisch äquilibrierte Salzlösungen.

Daß ähnlich zusammengesetzte Gemische von Salzlösungen auch als Suspensionsflüssigkeiten für Bakterien geeignet sein könnten, durfte umsomehr erwartet werden, als die allerdings spärlichen Versuche über die Wirkung von Salzen auf Bakterien zu gleichartigen Ergebnissen führten wie bei Pflanzen und Tieren. So fand v. Eisler[1]), daß Salze, die für sich allein unter gewissen Versuchsbedingungen entwicklungshemmend auf Bakterien wirken, bei Zusatz von 1- und 2-wertigen Salzen in bestimmtem Mengenverhältnis die Vermehrung der Bakterien nicht mehr hemmen. In den Versuchen von Lipman[2]) hemmten Kaliumchlorid sowie Natriumchlorid in isosmotischen Konzentrationen bestimmte Lebensäußerungen des Bac. subtilis nur wenig, schon stärker hemmte Magnesiumchlorid und ganz besonders stark Kalziumchlorid. Aber als Salzgemisch waren Natrium und Kalium, Natrium und Magnesium, Kalium und Kalzium fast unschädlich. Lemmermann, Eincke und Fischer[3]) zeigten, daß passend dosierte Zugaben von Kalk und Magnesia zum Boden eine — im Vergleich zu Kontrollbodenproben — enorme Vermehrung bestimmter Bodenbakterien hervorrufen.

Unter Zugrundelegung aller dieser Erfahrungen ging ich daran, für Bakterien, die weder in reinem Wasser noch in 0,85 proz. Kochsalzlösung lebensfähig bleiben, äquilibrierte Salzlösungen zu finden.

Allgemeine Versuchsbedingungen.

Zur Herstellung der verschiedenen Lösungen wurden chemisch reine Salze und destilliertes Wasser benutzt; das Wasser war von mir selbst aus Glas in Glas destilliert worden. Die Salze wurden bis zur dritten Dezimale gewogen. Die fertigen Lösungen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 25 Minuten im Dampftopf sterilisiert. — Zur Einsaat dienten frische Reinkulturen verschiedener Bakterienarten, die bei ihrer optimalen Temperatur auf Agarnährböden gezüchtet waren. Die Entfernung des Bakterienbelages von der Agaroberfläche erfolgte mit größter Vorsicht, um zu verhüten, daß Spuren von Agar oder von Kondenswasser mitübertragen würden. Eine Öse der 16- bis 20 stündigen Vegetations-

1) M. v. Eisler, Über Wirkungen von Salzen auf Bakterien. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. 51, S. 546 (1909).

2) B. Lipman, Toxic effects of „Alkali Salts" in soils on soil Bakteria. I. Ammonification. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 32, S. 585, 1912.

3) Lemmermann, Eincke und Fischer: Untersuchungen über die Wirkung eines verschiedenen Verhältnisses von Kalk und Magnesia in einigen Böden höhere Pflanzen und Mikroorganismen. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 32, S. 265, Jahrg. 1912.

masse wurde in 10 ccm der zu prüfenden Salzlösung sorgfältig aufgeschwemmt; 0,2 ccm der völlig homogenen, gründlich gemischten Suspension dienten als Einsaat für 50 ccm der betreffenden Lösung. Bei diesem Vorgehen wurde das Ziel erreicht, mit kleinen Keimmengen zu arbeiten. — Die bakterienhaltigen Salzlösungen blieben bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehen. Sofort nach der Einsaat, somit nach einmal 24, zweimal 24, dreimal 24, usw. Stunden wurde die Keimzahl der Aufschwemmungen durch Gießen von Agarplatten bestimmt. Um bei den hierbei nötigen Verdünnungen der Bakterienaufschwemmung mit einer sicher unschädlichen Flüssigkeit zu arbeiten, wurde 0,85 proz. Kochsalzlösung mit 10 proz. Zusatz von Bouillon benutzt. Die Kolonien wurden nach 24 Stunden gezählt und das Ergebnis nach 48 Stunden kontrolliert. — Die in den Tabellen pro 1 ccm angegebenen Keimzahlen sind die Mittelwerte aus dem Ergebnis von Parallelzählungen. Die Gesamtzahl meiner Versuche beträgt 392.

Versuchsergebnisse.

1. Vorversuche.

Ich untersuchte zunächst, welche Bakterienarten in 0,85 proz. Kochsalzlösung absterben. Folgende Bakterienarten wurden geprüft: Micr. pyog., Bact. septicaemiae haemorrh., Bact. typhi murium, Bact. acidi lactici, Bact. pyocyaneum, Bact. vulgare (Proteus vulgaris), Vibrio Metschnikovii. Tabelle I bringt eine Zusammenstellung dieser Versuche.

Tabelle I.

Verhalten verschiedener Bakterien in 0,85 proz. Kochsalzlösung.

Datum des Versuchs	Protokoll Nr.	Keimart	Einsaat	Keimzahl nach		
				1 Tag	2 Tagen	3 Tagen
4. VI.	11	M. pyog.	2 400 000	215 000	15 000	—
4. VI.	12	B. vulg.	2 000 000	800 000	75 000	—
28. VI.	47	Vibr. Metschn.	950 000	35 000	—	—
4. VII.	55	B. acid. lact.	1 500 000	1 400 000	1 000 000	400 000
4. VII.	56	B. sept. haemorrh.	2 200 000	2 400 000	1 200 000	750 000
4. VII.	57	B. pyocyan.	600 000	550 000	350 000	180 000
2. VIII.	185	B. typh. mur.	410 000	560 000	1 200 000	3 200 000

Wie Tab. I zeigt, vermehrt sich Bact. typhi murium in 0,85 proz. NaCl-Lösung deutlich, Bact. acidi lactici, Bact. sept. haemorrh. und Bact. pyocyaneum bleiben 1—2 Tage fast unverändert an Zahl, die auch nach 3 Tagen erst auf etwa 30% der Einsaat gesunken ist. Dagegen für Micr. pyog., Bact. vulg. und Vibr. Metschn. ist die 0,85 proz. NaCl-Lösung offensichtlich sehr different; schon nach einem Tage ist die Keimabnahme sehr stark, nach 2 Tagen leben von Bact. vulg. nur 3,75% der Einsaat,

von Micr. pyog. 0,6%, von Vibr. Metschn. ist in 1 ccm überhaupt kein Keim mehr nachweisbar.

Daß die drei Bakterienarten, Staphylokokken, Proteus und Metschnikoff in 0,85 proz. Kochsalzlösung auch bei Änderung der Versuchsanordnung rasch absterben, davon habe ich mich mehrfach überzeugt. Wie zu erwarten war, erfolgt das Absterben bei geringer Keimeinsaat besonders rasch.

Vergleichende Untersuchungen zeigten, daß es sich nicht um Eigentümlichkeiten zufällig benutzter Stämme handelte; so war von einem der Weilschen Fleckfieberproteusstämme eine Keimeinsaat von 290 000 in 0,85 proz. Kochsalzlösung ebenfalls nach 2 Tagen auf 0 gesunken. Vibr. Dunbar verhielt sich wie Vibr. Metschnikovii.

Daß das Kochsalz hier tatsächlich giftig wirkt, zeigte das Verhalten von Proteus, Staphylokokken und Metschnikoff in destilliertem Wasser. Allerdings muß hier unterschieden werden, ob das destillierte Wasser gewöhnliches Aqua destillata oder aus Glas in Glas redestilliertes Wasser ist. In gewöhnlichem destillierten Wasser ist bei Proteus und Metschnikoff eine Keimeinsaat von 80 000 Keimen pro 1 ccm nach 24 Stunden auf 0 gesunken, 200 000 Staphylokokken pro 1 ccm sind nach 2 Tagen abgestorben. Benutzt man jedoch redestilliertes Wasser als Aufschwemmungsmedium, so bleiben Proteus und Staphylokokken länger am Leben, als in 0,85 proz. NaCl-Lösung; nur Vibr. Metschnikovii erträgt destilliertes Wasser noch etwas schlechter als 0,85 proz. NaCl-Lösung; dies ist verständlich, da Vibrionen bekanntlich besonders empfindlich gegen osmotische Störungen sind.

Nachdem ich mich überzeugt hatte, daß Micr. pyog., Bact. vulgare und Vibr. Metschnikovii in phys. NaCl-Lösung unter den verschiedensten Bedingungen rasch absterben, untersuchte ich, ob diese drei Bakterienarten auch in anderen einfachen Salzlösungen schnell zugrunde gehen. Es wurden Micr. pyog. und Bact. vulg. in folgende Salzlösungen gebracht:

1. 0,5 proz. NH_4Cl -Lösung
2. 0,75 proz. KCl - „
3. 0,1 proz. $CaCl_2$ - „
4. 0,1 proz. $MgCl_2$ - „
5. 0,45 proz. Na_2SO_4 - „
6. 0,45 proz. K_2SO_4 - „
7. 0,5 proz. $MgSO_4$ - „

Die Lösungen waren sowohl mit einfach wie mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt.

In sämtlichen Salzlösungen waren die Bakterien am ersten oder spätestens zweiten Tage nach der Einsaat abgetötet, obwohl durchschnittlich 5 Mill. Keime pro 1 ccm eingesät waren. Demnach wirkten die einzelnen Salze in den angegebenen Konzentrationen giftig auf die Bakterien. Es war also erforderlich, Kombinationen von Salzen zu versuchen.

2. Versuche zur Auffindung äquilibrierter Salzlösungen für Vibr. Metschnikovii.

Ich hatte ursprünglich die Hoffnung, eine äquilibrierte Salzlösung zu finden, die gleichzeitig für a l l e kochsalzempfindlichen Bakterien geeignet wäre. Dieser Gedankengang ließ mich neben anderen Bakterien zunächst vor allem den Vibr. Metschnikovii als Studienobjekt wählen. Mußte es ja besonders verlockend erscheinen, eine ausbalanzierte Lösung für eine als so hinfällig bekannte Bakterienfamilie, wie die Vibrionen anzugeben.

Die Schwierigkeiten, die von vornherein erwartet werden mußten, waren recht groß. Ich habe die verschiedensten Kombinationen von Salzen angewandt, ohne ein befriedigendes Ergebnis erzielen zu können. Es wurden versucht Gemische von lediglich anorganischen Salzen NaCl, KCl, K_2SO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, NH_4Cl in den verschiedensten Kombinationen und Konzentrationen.

Da die Resultate ungünstig ausfielen, wurden versuchsweise Asparagin und einige organische Salze (Ammoniumlaktat, Kalziumlaktat) eingeführt. Gemische einzelner oder mehrerer dieser Verbindungen mit Natriumchlorid, Kaliumsulfat, Magnesiumsulfat waren bei passender Dosierung der einzelnen Komponenten vielfach imstande, Vibrio Metschnikovii mehrere Tage am Leben zu erhalten. Wurde in derartigen Lösungen die organische Verbindung in nur wenig erhöhter Konzentration zugefügt, so resultierten vielfach Lösungen, in denen sich die Vibrionen deutlich vermehrten; dies war z. B. bei Kombinationen mit Asparagin der Fall.

Diese Beobachtung legte den Gedanken nahe, daß die Vibrionen in den verschiedenen Lösungen durch irgendwelche Stoffe geschädigt würden und daß diese Schädigung lediglich verdeckt wird, wenn den Vibrionen gleichzeitig Stoffe von einem gewissen Nährwert in bestimmten Konzentrationen geboten werden.

Es stellte sich sehr bald heraus, daß diese Schädigung in der Beschaffenheit des destillierten Wassers lag. Das gewöhnliche, fertig bezogene A q u a d e s t i l l a t a enthält demnach Spuren von Stoffen, die genügen, um die empfindlichen Vibrionen auch in verschiedenen

Salzlösungen deutlich zu schädigen. Diese Wirkung bleibt aus, wenn man das destillierte Wasser selbst noch einmal aus Glas in Glas destilliert.

War ich zu dieser Erkenntnis, die die Ausschaltung von 176 Versuchen erforderte, auch auf einem Umweg gelangt, so war dieser Umweg doch nicht vergebens. Er hatte in meine Kombinationen anorganischer Salze u. a. ein organisches Kalziumsalz, das Kalziumlaktat, gespielt, das sich in meinen weiteren Versuchen als wertvolles Hilfsmittel zur Auffindung äquilibrierter Salzlösungen erwies.

Von den Versuchen, die ich nunmehr mit Vibr. Metschnikovii von neuem anstellte, führe ich nur die an, die für die schließliche Auffindung eines passenden Salzgemisches wichtig geworden sind. Ich benutze die Gelegenheit, einige der zahlreichen Vergleichsuntersuchungen, die ich vornahm, im Protokoll wiederzugeben, um die Differenz zwischen dem gewöhnlichen destillierten Wasser (in den Tabellen „Aqua destillata") und dem von mir aus Glas in Glas abermals destillierten Wasser (in den Tabellen „Aqua redestillata") zu zeigen.

Wurde Kaliumchlorid und Kalziumlaktat zu Natriumchloridlösungen hinzugefügt, so blieb Vibrio Metschnikovii je nach den Mengenverhältnissen der Komponenten länger am Leben, als in Natriumchloridlösungen allein. Als günstig erwies sich die Kombination:

NaCl = 0,5%
KCl = 0,5%
Calc. lact. = 0,5%

Hierin lebten von der kleinen Einsaat von 50 000 Keimen pro 1 ccm nach einem Tage noch 70% Keime.

Nun wurde eine passende Kombination von Natriumchlorid und Magnesiumchlorid gesucht. Sie fand sich in den Mengen

NaCl = 0,5%
$MgCl_2$ = 0,1%

Versuche, durch Kombinierung von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid und Kalziumlaktat eine äquilibrierte Lösung zu finden, führten zu einem befriedigenden Resultate (Tab. II, S. 10).

Es ist interessant, daß sich bei den Versuchen in Tab. II als passendste Lösung die erwiesen hat, in der die Salze in einem Mengenverhältnis enthalten sind, wie es in den Einzelkombinationen schon als relativ günstig aufgefallen war.

Tabelle II.

Verhalten von Vibr. Metschnikovii in Lösungen aus Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Kalziumlaktat.

Datum des Versuches: 8. Oktober.

Protokoll-Nr.	Lösung aus	Wasser	Einsaat	Keimzahl nach 1 Tag	2 Tagen	3 Tagen	4 Tagen
333	NaCl = 0,5% Calc.lact. = 0,1%	Aqu. dest.	50 000	—	—	—	—
334	KCl = 0,1% $MgCl_2$ = 0,1%	Aqu. red.	310 000	25 000	—	—	—
335	NaCl = 0,5% Calc.lact. = 0,5%	Aqu. dest.	425 000	105 000	38 000	15 000	8 000
336	KCl = 0,1% $MgCl_2$ = 0,1%	Aqu. red.	203 000	190 000	78 000	72 000	52 000
337	NaCl = 0,5% Calc.lact. = 0,5%	Aqu. dest.	48 000	22 000	—	—	—
338	KCl = 0,5% $MgCl_2$ = 0,1%	Aqu. red.	150 000	200 000	160 000	140 000	95 000
339	NaCl = 0,5% Calc.lact. = 0,5%	Aqu. dest.	260 000	60 000	55 000	10 000	—
340	KCl = 0,5% $MgCl_2$ = 0,5%	Aqu. red.	280 000	135 000	175 000	105 000	58 000
341	NaCl = 0,5% Calc.lact. = 0,1%	Aqu. dest.	38 000	—	—	—	—
342	KCl = 0,5% $MgCl_2$ = 0,5%	Aqu. red.	48 000	—	—	—	—
343	NaCl = 0,5% Calc.lact. = 0,1%	Aqu. dest.	105 000	—	—	—	
344	KCl = 0,1% $MgCl_2$ = 0,5%	Aqu. red.	70 000	65 000	48 000	18 000	—

Darnach ist eine äquilibrierte Salzlösung für Vibr. Metschnikovii eine Lösung von

NaCl = 0,5%,
KCl = 0,5%,
$MgCl_2$ = 0,1%,
Calc. lact. = 0,5%.

Daß dabei redestilliertes Wasser genommen werden muß, zeigen die Protokolle deutlich.

Leider war es nicht möglich, eine passende, rein anorganische Salzlösung für Vibr. Metschnikovii zu finden. Es wurde versucht, welchen Einfluß die Ersetzung von Kalziumlaktat durch Kalziumchlorid hat.

Tabelle III.

Verhalten von Vibr. Metschnikovii in Gemischen aus Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Kalziumchlorid.

Datum des Versuches	Protokoll-Nummer	Lösung aus	Einsaat	Keimzahl nach 1 Tag	Keimzahl nach 2 Tag
1. XI.	357.	$NaCl = 0{,}5\%$ $CaCl_2 = 0{,}1\%$ $KCl = 0{,}5\%$ $MgCl_2 = 0{,}1\%$	450 000	0	0
1. XI.	358	$NaCl = 0{,}5\%$ $CaCl_2 = 0{,}3\%$ $KCl = 0{,}5\%$ $MgCl_2 = 0{,}1\%$	830 000	400	0
5. XI.	359	$NaCl = 0{,}5\%$ $CaCl_2 = 0{,}5\%$ $KCl = 0{,}1\%$ $MgCl_2 = 0{,}1\%$	380 000	3300	0
5. XI.	360	$NaCl = 0{,}5\%$ $CaCl_2 = 0{,}8\%$ $KCl = 0{,}5\%$ $MgCl_2 = 0{,}1\%$	370 000	2600	0
5. XI.	361	$NaCl = 0{,}5\%$ $CaCl_2 = 1{,}0\%$ $KCl = 0{,}5\%$ $MgCl_2 = 0{,}1\%$	130 000	0	0
5. XI.	362	$NaCl = 0{,}5\%$ $CaCl_2 = 1{,}5\%$ $KCl = 0{,}5\%$ $MgCl_2 = 0{,}1\%$	175 000	0	0

Obwohl ich, wie Tab. III zeigt, die verschiedensten Mengen von Kalziumchlorid probierte, gelangte ich nicht zu einer ausgeglichenen Lösung. Ohne das organische Kalziumlaktat scheint darnach eine indifferente Lösung für Vibrio Metschnikovii nicht hergestellt werden zu können.

3. Versuche zur Auffindung äquilibrierter Salzlösungen für Micrococcus pyogenes aureus.

Es wurde zunächst geprüft, wie sich Staphylokokken verhalten in verschiedenen konzentrierten Lösungen von

1. Natriumchlorid und Kaliumchlorid,
2. Natriumchlorid und Kalziumchlorid,
3. Kaliumchlorid und Kalziumchlorid,
4. Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Kalziumchlorid.

Alle diese Gemische erwiesen sich als günstiger, als reine Kochsalzlösung; aber die Staphylokokken nehmen doch auch in ihnen dauernd an Zahl ab.

Da Kalziumchlorid schlecht ertragen zu werden schien, wurde auf Grund der Erfahrungen bei Vibr. Metschnikovii versuchsweise Kalziumchlorid ersetzt durch Kalziumlaktat. Tatsächlich bewirkt die Benützung von Kalziumlaktat an Stelle von Kalziumchlorid, daß sich das Absterben der Staphylokokken verzögert. Unter den geprüften Konzentrationskombinationen war am günstigsten die Mischung von:

$$NaCl = 0{,}5\%, \quad KCl = 0{,}5\%, \quad \text{Calc. lact.} = 0{,}5\%.$$

Nun wurden Kombinationen von Natriumchlorid und Magnesiumchlorid geprüft. Es ergab sich, daß am besten ertragen wurde die Mischung

$$NaCl = 0{,}5\%, \quad MgCl_2 = 0{,}5\%.$$

In einer gemeinsamen Versuchsserie wurden jetzt alle bisher verwendeten Salze NaCl, KCl, $MgCl_2$, Calc. lact. geprüft. Mit der gleichbleibenden Menge von 0,5 proz. NaCl wurden KCl, $MgCl_2$ und Calc. lact. in verschiedenen Konzentrationen kombiniert (Tab. IV, s. S. 13).

Unter den verschiedenen Kombinationen ist für Staphylokokken am günstigsten das Gemisch von

$$NaCl = 0{,}5 \text{ proz.}, \quad MgCl_2 = 0{,}5 \text{ proz.}$$
$$KCl = 0{,}5 \text{ proz.}, \quad \text{Calc. lact.} = 0{,}5 \text{ proz.}$$

Bemerkenswerterweise sind das dieselben Mengen, die bei der Einzelkombination einerseits von NaCl mit $MgCl_2$, anderseits von NaCl mit KCl und Calc. lact. am besten von Staphylokokken ertragen wurden.

Schließlich wurde auch diesmal versucht, ob nicht das organische Kalziumlaktat durch das anorganische Kalziumchlorid ersetzt werden könne.

Mit den gegebenen Mengen von NaCl = 0,5%, KCl = 0,5%, $MgCl_2$ = 0,5% wurden abgestufte Mengen von $CaCl_2$ vermischt. Es zeigte sich (Tab. V, s. S. 14), daß in dieser Kombination 0,1% $CaCl_2$ die günstigsten Resultate ergab.

Darnach ist ein einfaches für Staphylokokken indifferentes anorganisches Medium eine Lösung von

$$NaCl = 0{,}5\% \qquad MgCl_2 = 0{,}5\%$$
$$KCl = 0{,}5\% \qquad CaCl_2 = 0{,}1\%$$

Tabelle IV.

Verhalten von Micr. pyogenes in verschieden konzentrierten Kombinationen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Kalziumlaktat.

Datum d. Versuchs	Protokoll Nr.	Lösung aus	Wasser	Einsaat	Keimzahl nach 1 Tag	2 Tagen	3 Tagen	4 Tagen
29.IX.	321	NaCl = 0,5% Calc. lact. = 0,1%	Aqu. dest.	205 000	160 000	5 000	—	—
29.IX.	322	KCl = 0,1% $MgCl_2$ = 0,1%	Aqu. red.	165 000	105 000	100 000	85 000	45 000
29.IX.	323	NaCl = 0,5% Calc. lact. = 0,5%	Aqu. dest.	270 000	140 000	85 000	60 000	25 000
29.IX.	324	KCl = 0,1% $MgCl_2$ = 0,1%	Aqu. red.	175 000	165 000	90 000	90 000	80 000
29.IX.	325	NaCl = 0,5% Calc. lact = 0,5%	Aqu. dest.	70 000	85 000	90 000	68 000	54 000
29.IX.	326	KCl = 0,5% $MgCl_2$ = 0,1%	Aqu. red.	75 000	85 000	95 000	65 000	52 000
29.IX.	327	NaCl = 0,5% Calc. lact. = 0,5%	Aqu. dest.	255 000	285 000	220 000	200 000	160 000
29.IX.	328	KCl = 0,5% $MgCl_2$ = 0,5%	Aqu. red.	160 000	160 000	175 000	160 000	150 000
29.IX.	329	NaCl = 0,5% Calc. lact. = 0,1%	Aqu. dest.	140 000	158 000	123 000	65 000	62 500
29.IX.	330	KCl = 0,5% $MgCl_2$ = 0,5%	Aqu. red.	140 000	102 000	105 000	72 000	42 000
29.IX.	331	NaCl = 0,5% Calc. lact. = 0,1%	Aqu. dest.	220 000	205 000	140 000	105 000	115 000
29.IX.	332	KCl = 0,1% $MgCl_2$ = 0,5%	Aqu. red.	132 000	108 000	103 000	80 000	60 000

Natürlich ist das nicht die einzig mögliche ausgeglichene Lösung für Staphylokokken. Ich selbst bin bei anderen Versuchen, die ich nicht ausführlich erwähnen will, auf verschiedene Kombinationen gestoßen, die ebenfalls für Staphylokokken bemerkenswert indifferent sind. Es sind dies Lösungen folgender Zusammensetzung:

NaCl	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%
KCl	—	—	—	0,075%	0,075%
$MgCl_2$	0,4%	—	0,4%	0,4%	0,1%
$MgSO_4$	—	0,1%	—	0,1%	0,4%
K_2SO_4	—	—	0,1%	—	—
Calc. lact.	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%

Tabelle V.

Verhalten von Micr. pyogenes in verschieden konzentrierten Kombinationen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Kalziumchlorid.

Datum d. Versuchs	Prot. Nr.	Lösung aus	Einsaat	Keimzahl nach			
				1 Tag	2 Tagen	3 Tagen	4 Tagen
1. XI.	354	NaCl = 0,5% $CaCl_2$ = 0,1% KCl = 0,5% $MgCl_2$ = 0,5%	155 000	150 000	140 000	130 000	130 000
1. XI.	355	NaCl = 0,5% $CaCl_2$ = 0,3% KCl = 0,5% $MgCl_2$ = 0,5%	285 000	275 000	245 000	170 000	90 000
1. XI.	356	NaCl = 0,5% $CaCl_2$ = 0,5% KCl = 0,5% $MgCl_2$ = 0,5%	120 000	115 000	110 000	100 000	65 000

4. Versuche zur Auffindung äquilibrierter Salzlösungen für Bact. vulgare (Proteus vulgaris).

Nach einer Reihe von tastenden Orientierungsversuchen erschien es in Anbetracht der Erfahrungen bei Vibrio Metschnikovii und Micr. pyogenes aussichtsvoll, das Verhalten von Proteus in Gemischen von Natriumchlorid und Kalziumlaktat zu prüfen.

Bei der Zugabe von 0,5% Kalziumlaktat zu 0,5% Natriumchloridlösung vermehren sich die Proteusbazillen; in dem Gemisch 0,1% Kalziumlaktat — 0,5% Natriumchlorid tritt langsame Abnahme ein. Es wurde nun versucht, welchen Einfluß es hatte, wenn zu dem Gemisch

NaCl = 0,5%
Calc. lact. = 0,1%

weitere Salze, nämlich $MgCl_2$, K_2SO_4, $MgSO_4$ teils einzeln, teils in Kombinationen hinzugefügt wurden. Die Beigabe von Kaliumsulfat hatte zur Folge, daß die Proteusbazillen sich vermehren, während Magnesiumsulfat schädlich wirkte; auch die Zugabe von Magnesiumchlorid in dieser Kombination war ungünstig.

Daher wurden Versuche mit Hinzufügen von Kaliumchlorid angestellt, um die zu einander passenden Mengenverhältnisse von Natriumchlorid, Kalziumlaktat und Kaliumchlorid auszuprobieren.

Tabelle VI. Verhalten von Bact. proteus in Gemischen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Kalziumlaktat.

Datum d. Versuchs	Prot. Nr.	Lösung aus	Einsaat	Keimzahl nach 1 Tag	2 Tagen	3 Tagen	4 Tagen
9. VIII.	203	NaCl = 0,5% KCl = 0,2%	105 000	70 000	—	—	—
9. VIII.	204	NaCl = 0,5% KCl = 0,5%	140 000	80 000	80 000	60 000	—
10. IX.	286	NaCl = 0,5% Calc. lact. = 0,1% KCl = 0,1%	280 000	325 000	780 000	1 150 000	2 460 000
10. IX.	287	NaCl = 0,5% Calc. lact. = 0,1% KCl = 0,5%	450 000	565 000	570 000	760 000	1 900 000
10. IX.	288	NaCl = 0,5% Calc. lact. = 0,5% KCl = 0,1%	35 000	40 000	45 000	55 000	85 000
10. IX.	289	NaCl = 0,5% Calc. lact. = 0,1% KCl = 0,5%	45 000	70 000	75 000	90 000	140 000
26. VIII.	234	NaCl = 0,5% Calc. lact. = 0,1% KCl = 0,075%	200 000	600 000	2 300 000	2 300 000	—

In dem Gemisch von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Kalziumlaktat vermehren sich, wie Tab. VI zeigt, Proteusbazillen bei den verschiedensten Mengenverhältnissen; am ehesten kann als indifferent gelten die Kombination

NaCl = 0,5% KCl = 0,1% Calc. lact. = 0,5%.

Entsprechend den Erfahrungen bei Staphylokokken wurde daher versucht, wie die Einführung von Magnesiumchlorid wirkt.

In der Versuchsreihe von Tab. VII sind zwei Mengenkombinationen recht gut ausgeglichen:

NaCl	0,5%	0,5%	$MgCl_2$	0,1%	0,5%
KCl	0,1%	0,1%	Calc. lact.	0,5%	0,1%

Jetzt war es nur noch erwünscht, das Calc. lact. durch $CaCl_2$ zu ersetzen (s. Tab. VIII S. 17).

Aus Tabelle VIII geht hervor, daß sich bei geeigneten Mengenkombinationen an Stelle von Kalziumlaktat Calciumchlorid einführen läßt.

Tabelle VII.

Verhalten von Bact. proteus in Gemischen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Kalziumlaktat

Datum d. Versuchs	Protokoll Nr.	Lösung aus	Einsaat	Keimzahl nach 1 Tag	2 Tagen	3 Tagen	4 Tagen
22.IX.	310	NaCl = 0,5 % Calc. lact. = 0,1 % KCl = 0,1 % $MgCl_2$ = 0,1 %	50 000	40 000	20 000	15 000	15 000
22.IX.	311	NaCl = 0,5 % Calc. lact. = 0,5 % KCl = 0,1 % $MgCl_2$ = 0,1 %	55 000	35 000	55 000	40 000	50 000
22.IX.	312	NaCl = 0,5 % Calc. lact. = 0,5 % KCl = 0,5 % $MgCl_2$ = 0,1 %	55 000	55 000	60 000	35 000	5 000
22.IX.	313	NaCl = 0,5 % Calc. lact. = 0,5 % KCl = 0,5 % $MgCl_2$ = 0,5 %	30 000	35 000	20 000	—	—
22.IX.	314	NaCl = 0,5 % Calc. lact. = 0,1 % KCl = 0,5 % $MgCl_2$ = 0,5 %	115 000	80 000	15 000	—	—
22.IX.	315	NaCl = 0,5 % Calc. lact. = 0,1 % KCl = 0,1 % $MgCl_2$ = 0,5 %	105 000	100 000	95 000	70 000	45 000

Nach dem Ergebnis meiner Versuche ist ein einfaches anorganisches Medium für Proteusbazillen

NaCl	= 0,5%	$MgCl_2$	= 0,5%
KCl	= 0,1%	$CaCl_2$	= 0,5%

Vergleicht man die Zusammensetzung der äquilibrierten Lösung für Proteusbazillen mit dem Medium, das für Staphylokokken indifferent ist, so fällt auf, daß der Unterschied recht gering ist:

	Proteus	Staphylokokken
NaCl	0,5%	0,5%
KCl	0,1%	0,5%
$CaCl_2$	0,5%	0,1%
$MgCl_2$	0,5%	0,5%

Tabelle VIII. Verhalten von Bact. vulgare in verschieden konzentrierten Kombinationen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Kalziumchlorid.

Datum d. Versuchs	Prot. Nr.	Lösung aus	Einsaat	Keimzahl nach			
				1 Tag	2 Tagen	3 Tagen	4 Tagen
11. XI.	367	NaCl = 0,5% KCl = 0,1% $CaCl_2$ = 0,05%	180 000	175 000	130 000	85 000	—
11. XI.	368	NaCl = 0,5% KCl = 0,1% $CaCl_2$ = 0,05% $MgCl_2$ = 0,1%	240 000	150 000	75 000	15 000	—
11. XI.	369	NaCl = 0,5% KCl = 0,1% $CaCl_2$ = 0,1%	140 000	85 000	75 000	65 000	45 000
11. XI.	370	NaCl = 0,5% KCl = 0,1% $CaCl_2$ = 0,1% $MgCl_2$ = 0,1%	140 000	105 000	45 000	30 000	—
11. XI.	371	NaCl = 0,5% KCl = 0,1% $CaCl_2$ = 0,5%	130 000	95 000	80 000	42 000	30 000
11. XI.	372	NaCl = 0,5% KCl = 0,1% $CaCl_2$ = 0,5% $MgCl_2$ = 0,1%	110 000	70 000	18 000	7 000	—
11. XI.	373	NaCl = 0,5% KCl = 0,1% $CaCl_2$ = 0,5% $MgCl_2$ = 0,5%	105 000	105 000	90 000	90 000	85 000
11. XI.	374	NaCl = 0,5% KCl = 0,1% $CaCl_2$ = 0,5% $MgCl_2$ = 0,1%	125 000	100 000	85 000	25 000	8 000
11. XI.	375	NaCl = 0,5% KCl = 0,1% $CaCl_2$ = 1,0% $MgCl_2$ = 0,1%	105 000	70 000	—	—	—
11. XI.	376	NaCl = 0,5% KCl = 0,1% $CaCl_2$ = 1,5% $MgCl_2$ = 0,1%	200 000	110 000	—	—	—

Trotzdem lassen sich die beiden Lösungen nicht vertauschen (vgl. Tab. IX).

Tabelle IX.

Verhalten von Micr. pyogenes und Bact. vulgare in der für Micr. pyogenes und in der für Bact. vulgare äqulibrierten Lösung.

Datum d. Versuchs	Protokoll-Nr.	Lösung	Keimart	Einsaat	Keimzahl nach 1 Tag	2 Tagen	3 Tagen	4 Tagen
19. XI. 1919	385	Äquilibriert für Micr. pyog.	Micr. pyogenes	235 000	210 000	210 000	200 000	200 000
	386		Bact. vulgare	145 000	100 000	30 000	8 000	—
19. XI. 1919	387	Äquilibriert für Bact. vulg.	Micr. pyogenes	145 000	150 000	110 000	18 000	—
	388		Bact. vulgare	80 000	76 000	83 000	78 000	75 000

Wie Tabelle IX zeigt, nimmt Bact. vulgare in der für Staphylokokken adäquaten Lösung ab, Staphylokokken gehen in dem für Proteusbazillen indifferenten Medium zu Grunde.

Schlußfolgerungen.

Meine Untersuchungen haben gezeigt, daß Bakterien, die sowohl in reinem destilliertem Wasser wie in 0,85 proz. Kochsalzlösung rasch zugrunde gehen, in äquilibrierten Salzlösungen mehrere Tage lang lebensfähig bleiben.

Für Staphylokokken und Proteusbazillen konnten Gemische aus nur anorganischen Salzen gefunden werden, die in bestimmten Mengenverhältnissen „ausgeglichen" sind; es sind dies Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Kalziumchlorid.

Die gleichen Salze ergeben auch für Vibr. Metschnikovii eine ausbalanzierte Lösung, nur muß Kalziumchlorid durch das organische Kalziumlaktat ersetzt werden.

Für die Herstellung sämtlicher Lösungen ist doppelt destilliertes Wasser erforderlich, das aus Glas in Glas destilliert wurde.

Lebenslauf.

Ich, Max Franz Zeug, wurde geboren am 8. Mai 1890 zu Ratibor (Oberschlesien) als Sohn des Kaufmanns Franz Zeug und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Peisker.

In meiner Heimatstadt besuchte ich die Volksschule und das Humanistische Gymnasium, das ich Ostern 1911 mit dem Zeugnis der Reife verließ, um mich dem Studium der Veterinärmedizin zu widmen. Im 1. Semester studierte ich in München, die folgenden zwei in Berlin, woselbst ich auch das Tentamen physicum ablegte, die letzten drei Semester wieder in München. Bei Kriegsausbruch stand ich am Ende meines 7. Semesters, so daß ich Ende August 1914 die Notprüfung zur Erlangung der Approbation ablegen konnte. Am 1. Dezember 1914 trat ich als Kriegsfreiwilliger beim 4. Chevaulegers-Regiment in Augsburg ein. Ende Februar 1915 kam ich nach erfolgter Beförderung zum Unterveterinär ins Feld, Juni 1915 wurde ich zum Veterinär d. R. befördert. Stets an der Westfront, tat ich ununterbrochen bis zum Zusammenbruch Veterinärdienste bei den verschiedensten Formationen in Front und Etappe. Sofort nach der Rückkehr aus dem Felde stellte ich mich für Zwecke der Demobilmachung zur Verfügung und war im Dezember 1918 am Pferdelazarett München und im Januar und Februar 1919 beim 9. Feld-Art.-Regt. in Landsberg als Veterinär tätig. Am 1. März 1919 wurde ich aus dem Militärdienst entlassen.